



⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Patentschrift**  
⑩ DE 43 34 677 C 1

⑮ Int. Cl. 5:  
**C 12 M 3/00**  
C 12 M 1/34  
G 02 B 21/34  
C 12 Q 1/00  
B 01 L 3/00

⑯ Aktenzeichen: P 43 34 677.4-41  
⑯ Anmeldetag: 12. 10. 93  
⑯ Offenlegungstag: —  
⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung: 28. 7. 94

DE 43 34 677 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Innere Priorität: ⑯ ⑯ ⑯

26.03.93 DE 43 09 962.9

⑯ Patentinhaber:

Birke, Roland, 63927 Bürgstadt, DE

⑯ Erfinder:

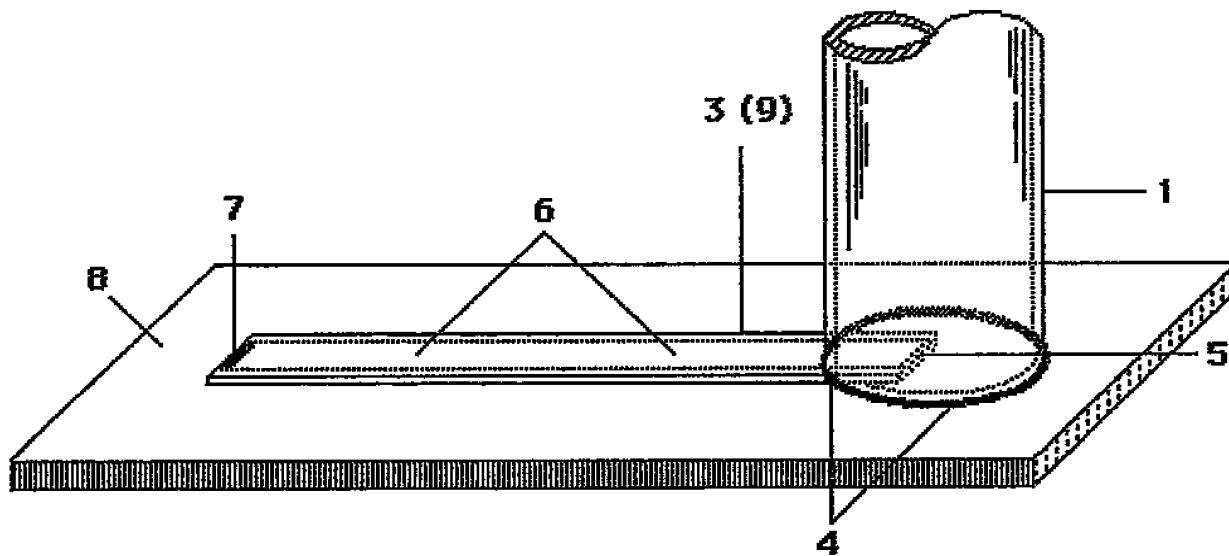
gleich Patentinhaber

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:

DE-OS	34 46 908
DE-GM	91 01 082
JP	01-3 17 383
JP	01-3 12 992

⑯ Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld, für mikroskopische Untersuchungen

⑯ Die Erfindung betrifft ein Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld für mikroskopische Untersuchungen, gemäß Fig. 1.



DE 43 34 677 C 1

## Beschreibung

In der Offenlegungsschrift Nr. DE 34 46 908 ist ein Gerät zur überwachenden Beobachtung von Mikroorganismen beschrieben. Das Gebrauchsmuster Nr. DE-G 91 01 082.9 beschreibt eine Einrichtung zur Überprüfung des morphologischen Zustands von Biomassen in Fermentern. Eine Apparatur für die automatische Beobachtung von Mikroorganismen in Flüssigkeiten mit Videokamera beschreibt die japanische Offenlegungsschrift Nr. 1-312992. Diese Geräte und Einrichtungen sind mit elektronischen Steuerungen versehen und in der Herstellung aufwendig und teuer. Weiterhin stehen sie in direktem Zusammenhang mit großen Anlagen wie Klärbecken und Fermentern. Die japanische Offenlegungsschrift Nr. 1-317383 beschreibt ein Containerpaar mit Beobachtungsfenster. Dieses Gerät muß zum Auffüllen umgedreht und verschlossen werden. Das Beobachtungsfenster ist durch das Containerpaar eng begrenzt.

Die nachstehend offenbare Erfindung ist ein System, das sich auf einem mikroskopischen Standardobjektträger befindet und einfach und billig herzustellen ist. Handelsübliche Lichtmikroskope ermöglichen ohne Zubehör oder Umbau den Gebrauch der Erfindung. Zudem werden lichtmikroskopische Eigenschaften nicht beeinträchtigt, da Deckgläser mit 0,17 mm Dicke verwendet werden, die sich in korrekter Planlage befinden. Zur mikroskopischen Beobachtung ist ein großes Feld vorhanden das auch dazu verwendet werden kann, Flüssigkeiten mit kleinen Partikeln im Durchfluß, der jederzeit gestoppt werden kann, zu mikroskopieren. Weiterhin besteht die Möglichkeit, während des Mikroskopierens Flüssigkeiten einzubringen, zu durchmischen, oder zu entnehmen. Die Wiederverwendungsmöglichkeit nach einfacher Reinigung ist ein weiterer Vorteil.

Die Erfindung betrifft ein Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld für mikroskopische Untersuchungen. Aufgabe der Erfindung ist es, Mikroorganismen einen dauerhaften Lebensraum in einer Nährösung von ca. 1 ml. zu bieten, der sich in ein Beobachtungsfeld (6) für mikroskopische Untersuchungen in geeigneter Schärfentiefe, ausdehnt. Die im Beobachtungsfeld (6) lebenden Mikroorganismen haben Verbindung (5) zum Kulturgefäß (1) und können über lange Zeit studiert werden, ohne daß sie aus einem Gefäß durch Pipetten entnommen werden müssen. An der Innenwand des Beobachtungsfeldes (6) lebende Mikroorganismen können unberührt betrachtet werden, so daß morphologische Untersuchungen an Mikroorganismen über längere Zeit möglich sind.

Die Erfindung kann im Lichtstrahlengang jedes handelsüblichen Lichtmikroskops mit verschiedenen Beleuchtungen (z. B. Helfeld, Dunkelfeld, Phasenkontrast) mikroskopiert werden. Für stark vergrößerte Stereoluppen ist die Erfindung ebenso zu gebrauchen.

Auf einfache Weise lassen sich mit der Erfindung mikrobiologische Phänomene studieren. Anwendungsmöglichkeiten sollen hydrobiologische Laboruntersuchungen, mikroskopische Kontrolle von Flocken der Belebtschlammbecken in Kläranlagen, limnologische und marine Planktonuntersuchungen, Demonstrationen an Mikroskopen auf Fachmessen, dauerhafte Einrichtungen in Botanischen Gärten, Zoo's oder naturkundlichen Museen und Anbindung an TV- und andere Bildübertragungs- und Aufzeichnungssysteme sein. Weiterhin soll die Erfindung auch als Lehrhilfsmittel oder Lehrspielzeug Verwendung finden können. Die Erfindung soll darüber hinaus aus Glas oder Kunststoff ein-

fach und billig herstellbar sein.

Diese Aufgabe wird durch ein Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld, gemäß Fig. 1 gelöst.

Die Herstellung eines Kulturgefässes mit Beobachtungsfeld erfolgt durch dauerhaft abdichtend klebender Montage zweier, parallel angeordneter Rund- oder Flachstäbe, auf einem Objektträger mit einem Deckglas. Die Flachstäbe können hierbei ca. 0,25 mm dicke Streifen aus Glas, oder Kunststoff sein, die mit Klebstoff beschichtet sind, oder mit Klebstoff beschichtete Glas- oder Kunststoffstäbe von ca. 0,25 mm Durchmesser. Das Kulturgefäß besteht aus einer Gewindeflasche, deren Boden abgeschnitten ist und an der Stirnseite außen dichtend und dauerhaft mit Objektträger und Deckglas verklebt ist, wobei die Verbindung zum Beobachtungsfeld innen offen bleibt.

Eine andere Herstellungsmöglichkeit des Kulturgefäßes mit Beobachtungsfeld besteht darin, eine ca. 0,25 mm tiefe Rinne in einen Objektträger zu schleifen und zu polieren. Das Beobachtungsfeld wird dadurch gebildet, indem der Objektträger mit einem Deckglas dichtend und dauerhaft verklebt wird. Die Stirnseite des Kulturgefäßes wird anschließend mit Objektträger und Deckglas außen dichtend dauerhaft verklebt, so daß die Verbindung zum Beobachtungsfeld innen offen bleibt.

Eine weitere Möglichkeit ein Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld herzustellen, erfolgt durch Aufschleifen des Bodens einer Flasche gerade soweit, bis im rechten Winkel zur stehenden Flasche eine Flachkapillare eingeführt werden kann, die dann mit der Flasche außen dauerhaft dichtend verklebt wird, wobei die Verbindung zum Beobachtungsfeld innen offen bleibt. Nachträglich kann die Flasche vorübergehend oder dauerhaft z. B. auf einen Objektträger klebend montiert werden. Für die dichtenden und dauerhaften Verbindungen o.g. Arbeitsschritte sollten Kleber verwendet werden, die eine hohe Endfestigkeit mit glasähnlichen Eigenschaften (Beständigkeit gegenüber Temperatur, Wasser, Lösungsmittel, verdünnte Säuren und Laugen sowie Chemikalien) erreichen, z. B. UV-Kleber oder 2-Komponentenkleber mit Wärmebehandlung.

Die obere Wand des Beobachtungsfeldes sollte ca. 0,17 mm stark sein. Die Vertiefung im Deckglas, der Querschnitt der Stäbe, oder die Höhe der Mikroklivette sollte ca. 0,25 mm betragen. Der Objektträger sollte die Abmessungen von 76 mm x 26 mm x 1 mm haben. Das Volumen des Kulturgefäßes sollte ca. 1 ml. betragen. Um ein leichteres Arbeiten am Mikroskop zu ermöglichen, kann das Gefäß nach schräg außen angebracht sein (Fig. 12).

Die Zeichnung Fig. 1 zeigt die Erfindung von schräg oben. Fig. 2 + 3 stellt den Querschnitt des Beobachtungsfeldes (6) in Ausführung als einen Objektträger (8) mit Stäben (11) verklebtem Deckglas (9) dar. Fig. 5 zeigt die Ausführung als eine Vertiefung in einem Objektträger (8) mit abgedichtetem (10) Deckglas (9) und Fig. 6 zeigt die Ausführung als Mikroklivette (3) auf einem Objektträger.

Die Zeichnung Fig. 7 + 8 zeigt ein Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld in Ausführung einer Gewindeflasche (13) mit Flachkapillare (3).

Die Zeichnung Fig. 9 zeigt die Ausgestaltung eines Kulturgefäßes mit Beobachtungsfeld mit einer zweiten Flasche.

Die Zeichnung Fig. 10 zeigt die Anordnung für Versuche mit Mikroorganismen, wobei elektrische Reize sichtbar gemacht werden.

Die Zeichnung Fig. 11 zeigt die Manipulation der

Flüssigkeit im Kulturgefäß z. B. Entnehmen, Einbringen oder Durchmischen der Kulturflüssigkeit oder Reagenzien mit einer Injektionsspritze durch ein Septum (17).

Die Zeichnung Fig. 12 zeigt das Absaugen der austretenden Flüssigkeit mittels einer Pipette, sowie ein schräg angebrachtes Kulturgefäß, um das Arbeiten unter einem Mikroskop zu erleichtern.

Die Handhabung der Erfindung ist folgend beschrieben:

1. Das Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld in Schrägstellung bringen, so daß das Ende des Beobachtungsfeldes nach oben zeigt und den Schraubverschluß (2) entfernen.
2. Mit einer Pipette Flüssigkeit in das Kulturgefäß (1) (13) geben und in waagerechte Lage bringen, so daß sich das Beobachtungsfeld (6) mit Flüssigkeit füllt.
3. Das Kulturgefäß verschließen. Unter einem Mikroskop kann nun das Beobachtungsfeld, in dem sich Flüssigkeit mit Partikeln befindet, betrachtet werden. Die Flüssigkeit des Kulturgefässes kann durch Öffnen des Verschlusses (Fig. 12) (Schraubverschluß aufdrehen) und Absaugen der am Ende des Beobachtungsfeldes austretenden Flüssigkeit im Durchfluß mikroskopiert werden. Das Absaugen der austretenden Flüssigkeit kann mit einer Pipette, einem Wattestäbchen, oder mit Fließpapier erfolgen. Für längere dauernde Untersuchungen kann das Ende des Beobachtungsfeldes (7) mit Vaseline, Silicon oder Kitt dauerhaft oder vorübergehend verschlossen werden.
4. Um das gebrauchte Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld zu reinigen, ist die Dichtung (7) zu entfernen. Dann kann mit einer Injektionsnadel Fig. 10 (21) durch den Verschluß (2) in dem sich ein Septum (17) befindet, unter Druck mit der Spritze (20) eine Reinigungslösung (19) durchgespült werden. Mit einem Schaber, der aus einem schmalen Streifen dünner Kunststofffolie besteht, können an der Innwand des Beobachtungsfeldes (6) festsitzende Partikel gelöst werden. Nachspülen mit destilliertem Wasser und Trocknung des Beobachtungsfeldes (6) ermöglicht bei Wiederverwendung eine luftblasenfreie Füllung des Beobachtungsfeldes. Weiterhin besteht die Möglichkeit, ein Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld mit abgenommenem Verschluß (2), in einem Ultraschallbad zu reinigen.
5. Flüssigkeiten können aus der Kulturlösung entnommen oder eingebracht werden, indem die Injektionsnadel Fig. 10 (21) einer Spritze durch das Septum (17) in das Kulturgefäß eingeführt wird. Durch Bewegung des Kolbens (20) kann die Flüssigkeit in dem Beobachtungsfeld (6) mit der Kulturlösung und mit den eventl. eingebrachten Flüssigkeiten durchmischt werden.
6. Um beim Mikroskopieren mit dem Objektiv nicht an das Kulturgefäß (1) zu stoßen, kann auf dem Beobachtungsfeld eine Markierung (18) angebracht werden (z. B. mit einem roten Glasschreistift).
7. Wird mit mehreren Objektiven gearbeitet und soll der Objektivrevolver gedreht werden, so ist am Nonius des Kreuztisches die Stelle zu merken, um nach Wegfahren und Objektivwechsel die Stelle wiederzufinden.
8. Das Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld kann bei entsprechender Abdichtung (7) als steriles, ge-

schlossenes System gehandhabt werden und ist auch für die Kultur oder längere Hälterung anaerober Mikroorganismen zu gebrauchen. Weiterhin können äußere Einflüsse, z. B. Aufbewahrung in Kühl- oder Brutschränken oder radiologische Manipulationen untersucht werden.

In besonderer Ausgestaltung der Erfindung werden Stromleiter angebracht und die Reaktion auf elektrische Reize bei Einzellern sichtbar gemacht. Auf der Zeichnung (Fig. 10) ist ein Ausführungsbeispiel dargestellt.

Das Kulturgefäß (1) mit Beobachtungsfeld (6) ist auf einem Objektträger (8) angebracht, mit einer Pantoffeltierchenkulturlösung gefüllt und am Ende des Beobachtungsfeldes mit Vaseline abgedichtet (7). Die in die Flüssigkeit eingeführten Stromleiter (15 + 16) werden an den Anschlüssen mit einer umpolbaren Gleichstromquelle mit der Stromstärke von ca. 6V verbunden. Unter einem Mikroskop sind im Beobachtungsfeld (6) der Erfindung die Pantoffeltierchen im elektrischen Feld zum Minuspol schwimmend zu sehen. Wird umgepolt, kehren die Einzeller sofort um und schwimmen erneut Richtung Kathode.

Ein weiteres einfache zu handhabendes Phänomen ist die phototaktische Reaktion lichtsuchender Grünalgen. Das Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld ist mit einer Grünalgenkulturlösung (z. B. Euglena) gefüllt. Im Lichtstrahlengang des Mikroskops ist im Beobachtungsfeld (6) nach kurzer Zeit eine Ansammlung der Grünalgen zu sehen. Aus- und wieder Einschalten der Lichtquelle läßt die Algen erneut im Blickfeld erscheinen.

Weiterhin kann die Erfindung als fertiger Kultursatz gehandhabt werden. (Manche Mikroorganismen bilden bei Austrocknung Cysten, in denen sie lange Zeit in schlafähnlichem Zustand überleben. Bei günstigen Lebensbedingungen erwachen sie zu normalem Leben mit Fortbewegung, Nahrungsaufnahme und Fortpflanzung. Das Kulturgefäß kann Nährstoffe mit Cysten in trockenem Zustand enthalten. Das Auffüllen des Kulturgefäßes mit destilliertem Wasser genügt, um die Lebenvorgänge zu aktivieren.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist ein zweites Kulturgefäß auf dem Objektträger am Ende des Beobachtungsfeldes angebracht Fig. 9. Die mikroskopische Untersuchungsmöglichkeit von durchfließenden Flüssigkeiten im Beobachtungsfeld ist folgend beschrieben:

1. Das linke Kulturgefäß ist mit einem Schraubverschluß luftdicht verschlossen.
2. Das rechte Kulturgefäß ist offen und wird mit einer Flüssigkeit gefüllt.
3. Unter dem Mikroskop entweicht durch Aufdrehen des linken Verschlusses Luft und läßt die Hälfte der Flüssigkeit durch das Beobachtungsfeld (6) fließen. Dieser Vorgang kann durch Zudrehen des Verschlusses jederzeit gestoppt werden.
4. Absaugen der Flüssigkeit im linken Gefäß mit einer Pipette bewirkt den Durchfluß der restlichen Flüssigkeit durch das Beobachtungsfeld.

Schließlich kann das Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld auch dazu verwendet werden, kleine anorganische Partikel, die sich in einer Flüssigkeit befinden, zu mikroskopieren.

1 Kulturgefäß (Gewindeflasche mit entferntem Boden)	
2 Verschluß (Kunststoffschoraubverschluß)	
3 Flachkapillare	
4 Dauerhaft dichtende Verklebung (z. B. UV-Kleber od. 2-Komponentenkleber)	5
5 Offene Verbindung zum Beobachtungsfeld	
6 Beobachtungsfeld	
7 Vorübergehende oder dauerhafte Dichtung (z. B. mit Vaseline, Kitt oder Silikon)	
8 Objekträger	10
9 Deckglas	
10 Dauerhaft dichtende Verklebung	
11 Dauerhaft dichtend verklebte Rund- oder Flachstäbe	
12 Schleiffläche der Gewindeflasche	
13 Gewindeflasche mit aufgeschliffenem Boden	15
14 Dauerhaft verbindende Dichtung zwischen Gewindeflasche und Flachkapillare	
15 Stromleiter (Anode)	
16 Stromleiter (Katode)	
17 Septum (Schraubverschlußeinsatz)	20
18 Markierung (rote Folie, oder mit Glasschreibstift angebracht).	
19 Einzubringende oder entnommene Flüssigkeit (z. B. Kulturflüssigkeit, Reagenzien oder Reinigungsfluid)	
20 Injektionsspritze	25
21 Injektionsnadel	
22 Flüssigkeit mit Partikel	
23 Pipette (zum Absaugen der austretenden Flüssigkeit)	

## Patentansprüche

des Beobachtungsfeldes ein abgedichteter Stromleiter (16) angebracht werden kann (Fig. 10), wobei Fig. 10 Bestandteil des Anspruchs ist.

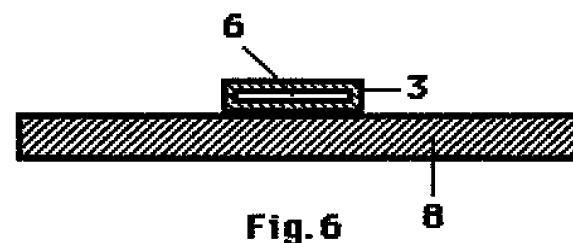
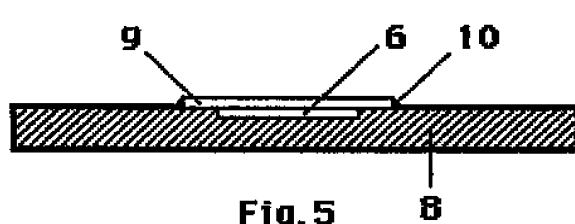
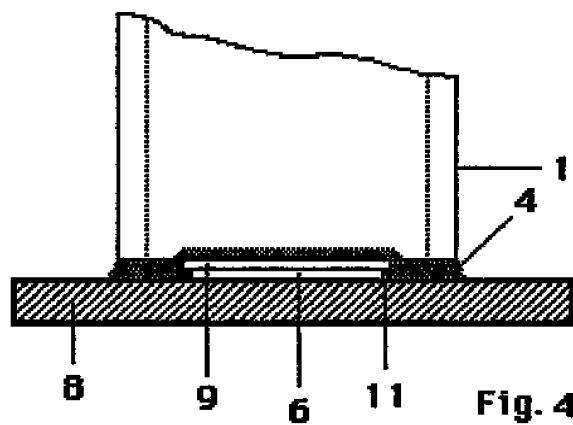
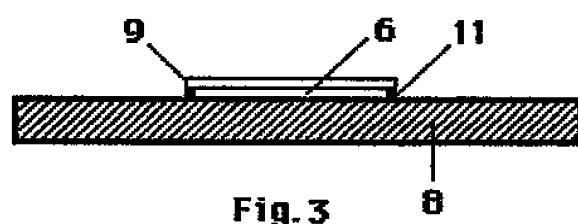
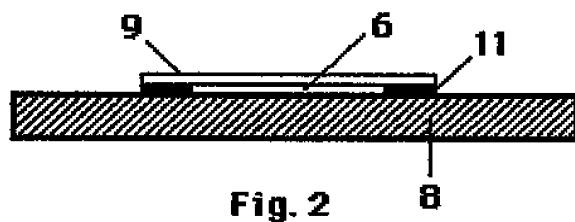
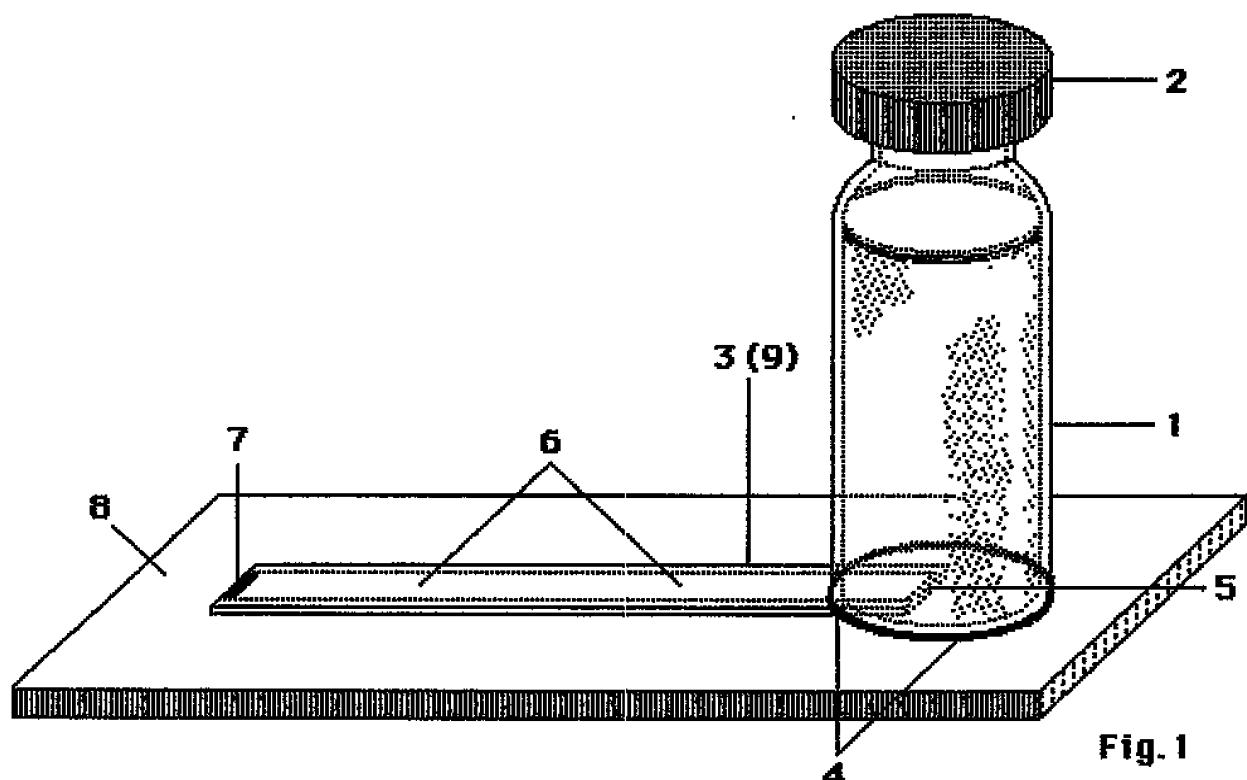
8. Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Gefäß (1) verschließbar ist.

9. Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß Pipetten oder Kanülen durch den Verschluß (2) gesteckt und Flüssigkeiten in das Kulturgefäß (1) und (13) eingebracht werden können (Fig. 10), wobei Fig. 10 Bestandteil des Anspruchs ist.

10. Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß am Ende des Beobachtungsfeldes ein zweites verschließbares Gefäß mit offener Verbindung (5) zum Beobachtungsfeld (6) angebracht sein kann (Fig. 9), wobei Fig. 9 Bestandteil des Anspruchs ist.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

1. Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld, gekennzeichnet durch ein Gefäß (1) mit offener Verbindung (5) zu einem Beobachtungsfeld (6) für mikroskopische Untersuchungen, gemäß Fig. 1, wobei Fig. 1 Bestandteil des Anspruchs ist.
2. Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß ein dünnwandiges Beobachtungsfeld (6) für mikroskopische Untersuchungen, das durch einen Objekträger (8) mit Deckglas (9) und verklebten Stäben (11) gebildet ist, mit einem dickwandigen Rohr (1), oder Kulturgefäß, an der Stirnseite dichtend (4) durch Verklebung dauerhaft verbunden wird, wobei das Beobachtungsfeld (6) innen offen bleibt (5).
3. Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Beobachtungsfeld (6) als eine Vertiefung in einem Objekträger (8) mit einem verklebten (10) Deckglas (9) ausgebildet sein kann.
4. Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Beobachtungsfeld (6) als eine Mikroküvette (3) ausgebildet sein kann.
5. Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine Mikroküvette (3) durch ein am Boden aufgeschliffenes (12) Gefäß (13) eingeführt und außen dichtend (4) durch Verklebung dauerhaft verbunden werden kann, wobei das Beobachtungsfeld (6) innen offen bleibt (5).
6. Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Beobachtungsfeld (6) am Ende abgedichtet (5) werden kann.
7. Kulturgefäß mit Beobachtungsfeld nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß am Ende



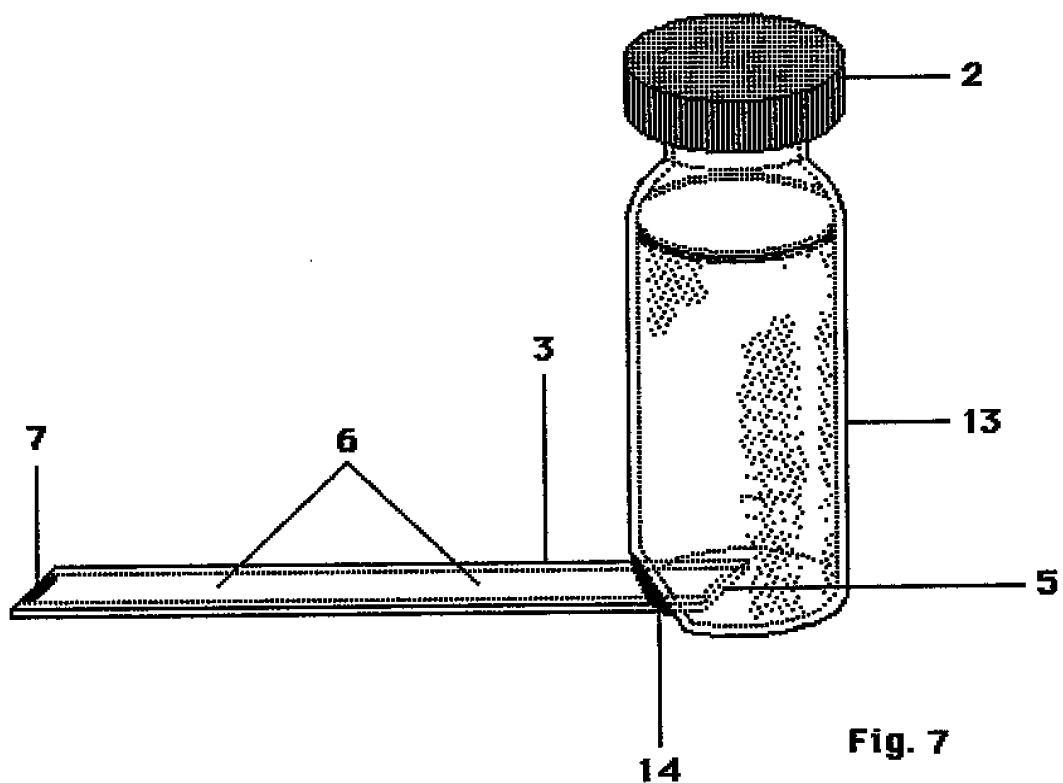


Fig. 7

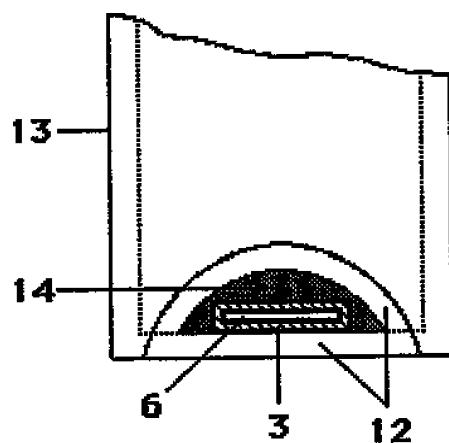


Fig. 8

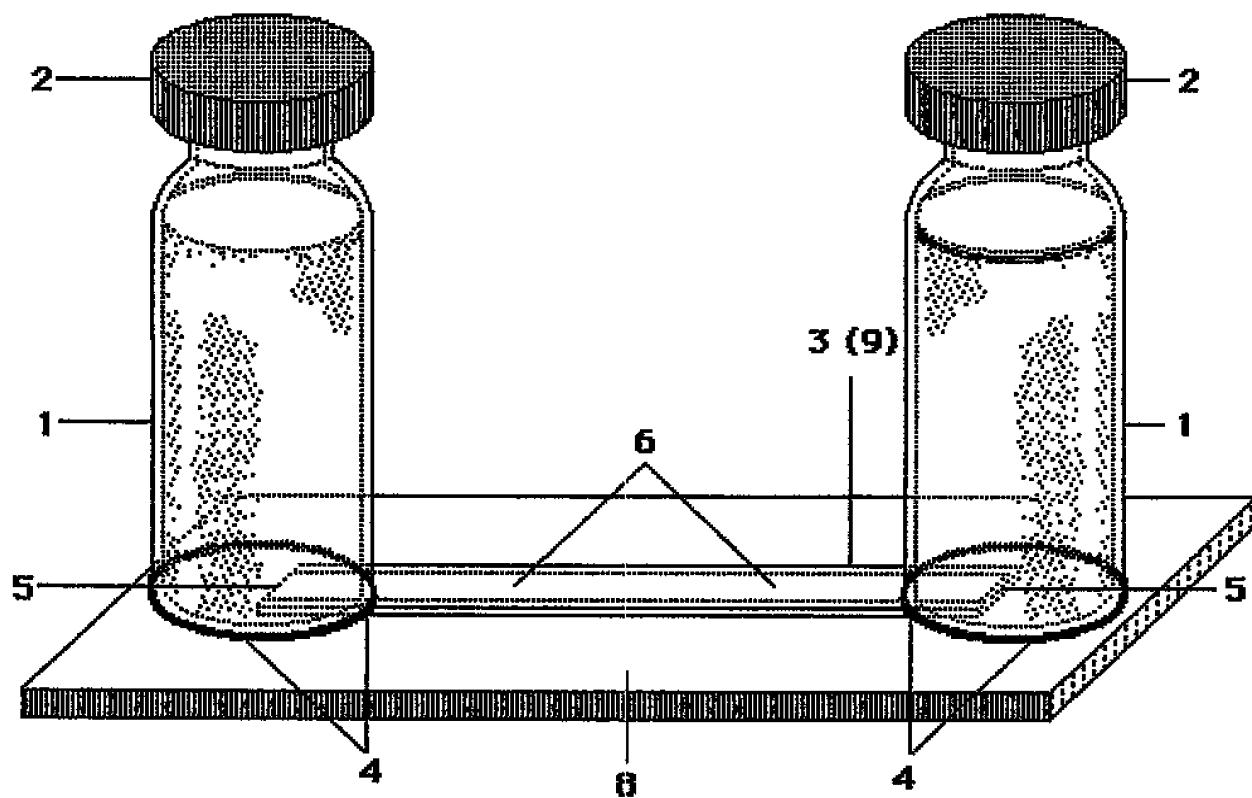


Fig. 9

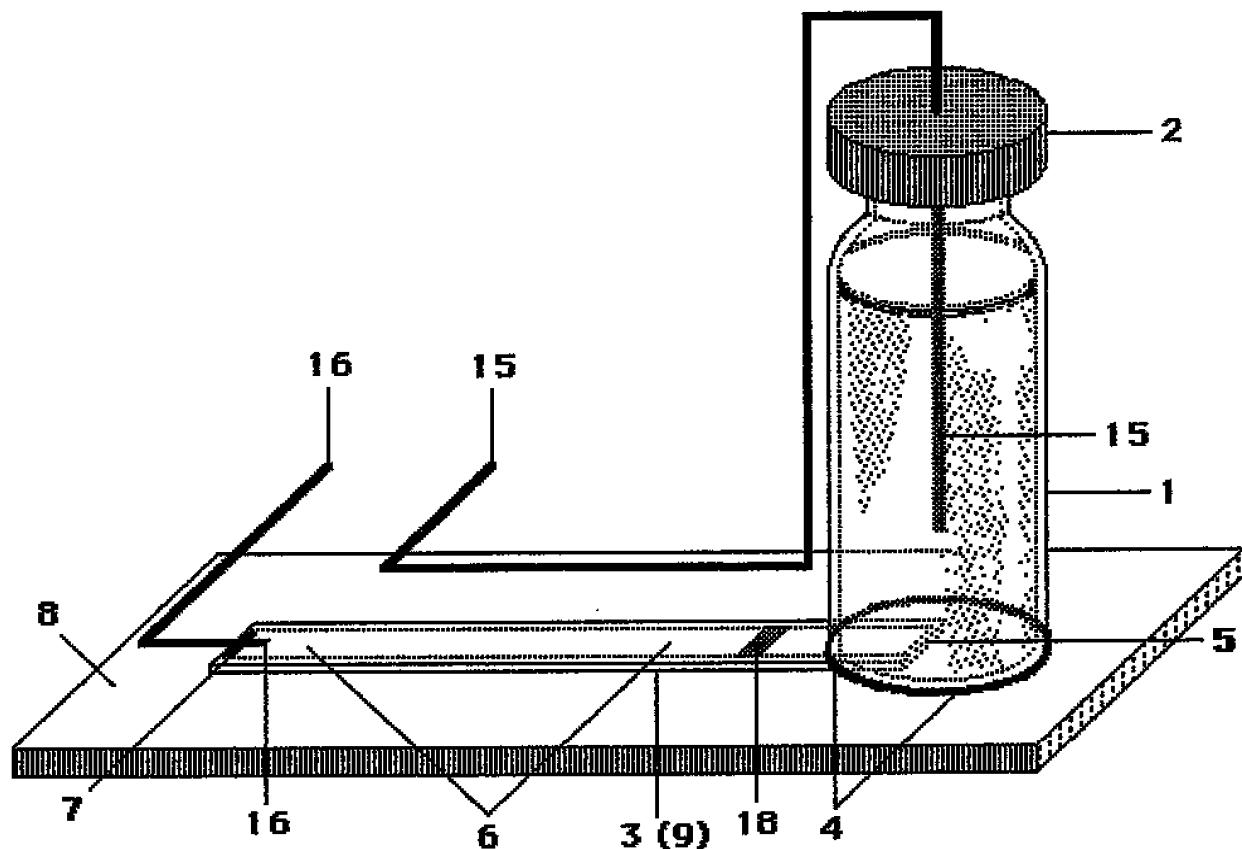


Fig. 10

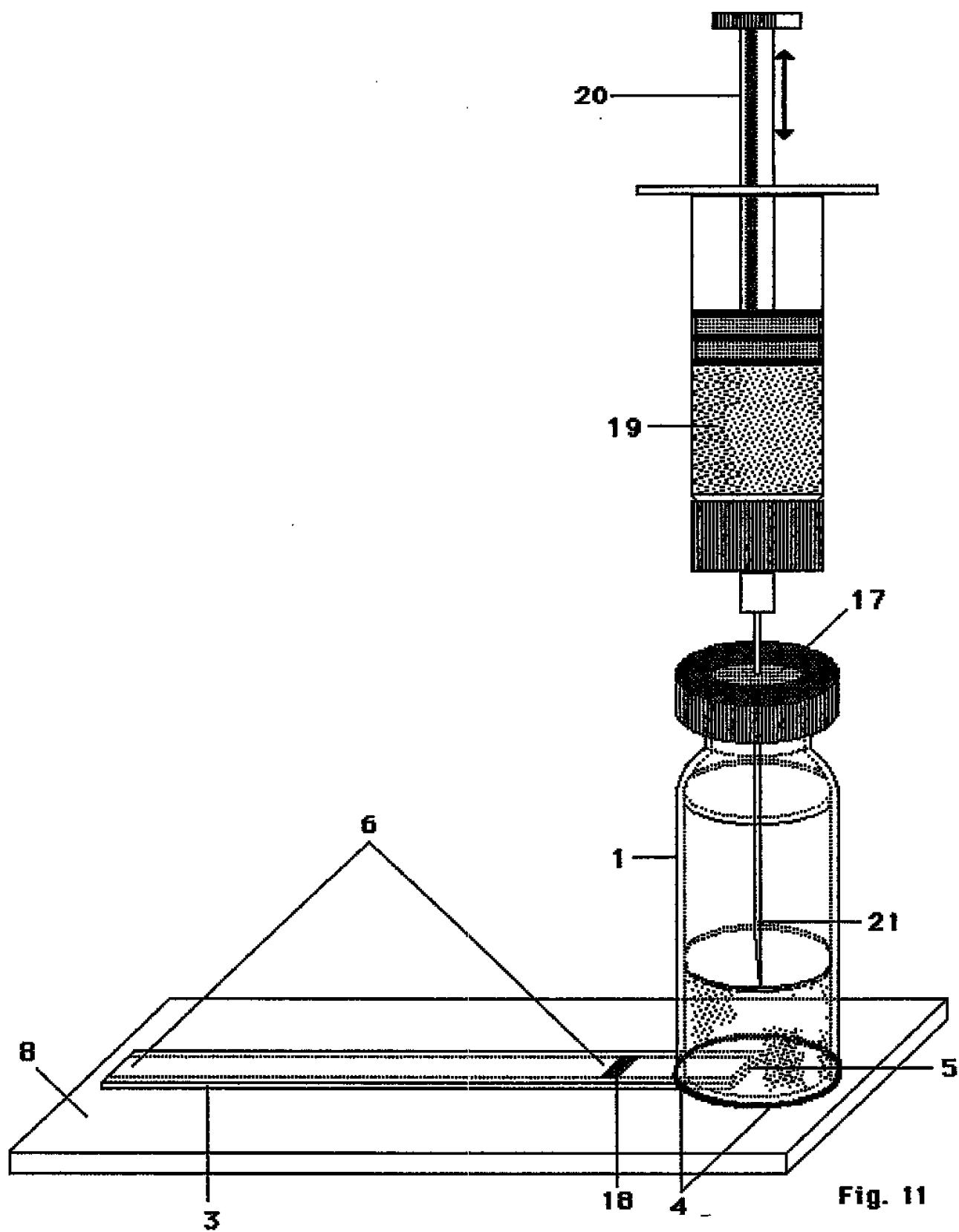


Fig. 11

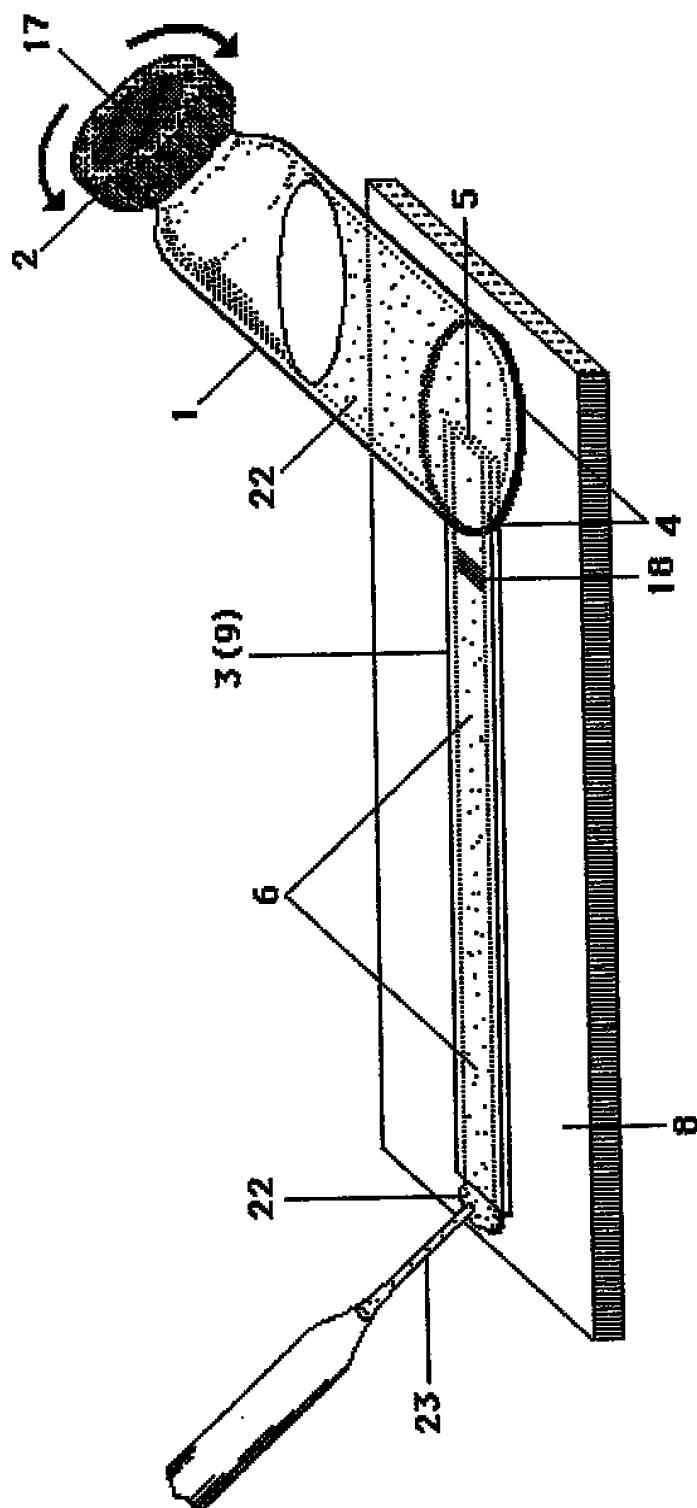


Fig. 12